



0721775-1

На правах рукописи

Буторина Ольга Тимофеевна

**Дифференциация митохондриальных генов цитохрома b и контрольного
региона и ядерного c-mos гена у тетеревиных птиц на основе биохимического и
филогенетического анализа**

Специальность 03.00.04

**Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата биологических наук**

Казань 2001

Работа выполнена в Институте Биологических проблем Севера ДВО РАН и на биостанции "Vogelwarte" университета Грейфсвальда (Hiddensee, Германия).

Научный руководитель: -

д.б.н. Соловечук Леонид Леонтьевич

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА
КФУ



0000975625

Официальные оппоненты: -

д.б.н. Чернов В. М.

к.б.н. Акберова Н. И.

Ведущая организация

Институт молекулярной биологии

им. В. А. Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится "17" "мая" 2001 г.

в 14³⁰ часов на заседании диссертационного Совета Д 212.081.08

при Казанском государственном университете В.И. Ульянова-Ленина по адресу:

420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан 16 04 2001 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета

к.б.н., доцент

Аскарова

А. Н. Аскарова

Актуальность проблемы.

Построение естественной системы, отражающей филогенетическое родство организмов, является важнейшей задачей биологии. В настоящее время молекулярная филогения и систематика претерпевают новый этап в своем развитии. Это связано в первую очередь с разработкой новых молекулярно-генетических методов, позволяющих не только получить новую информацию о нуклеотидных последовательностях, но также исследовать возможные биохимические механизмы, определяющие нуклеотидный состав и особенности системы кодирования. В эволюционном плане ДНК – очень лабильная молекула, поэтому выбор филогенетического маркера, анализ нуклеотидных последовательностей которого позволил бы сделать достаточно достоверные выводы о родстве организмов, непростая и важная задача. Выбор такого не возможен без детального изучения его молекулярно-генетических и биохимических особенностей. В последнее время появилось множество работ, в которых митохондриальный геном или его отдельные гены удачно использовались в качестве такового. Тем не менее, существуют и работы, в которых описаны явления, например такие, как гетероплазмия, ядерные копии, затрудняющие использование этой молекулы в качестве филогенетического маркера. Применение определенных молекулярно-генетических методических подходов, позволяющих исключать подобные явления, а также использование современных компьютерных программ для построения схем филогенетического родства организмов, способных достаточно достоверно распознавать филогенетические сигналы, в большинстве своем, как правило, позволяют использовать молекулу митохондриальной ДНК в качестве надежного филогенетического маркера родства. В настоящее время продолжается поиск и других молекулярных маркеров, в том числе ядерных. Проведенное исследование филогенетического родства с-тос гена ядерного генома у тетеревиных – одна из первых попыток использования информации о нуклеотидных последовательностях этого участка генома в качестве маркера на уровне семейства.

Цель работы. Исследование биохимических и молекулярно-генетических особенностей гена цитохрома b митохондриального генома у тетеревиных. Использование особенностей структуры генов цитохрома b и левого домена контрольного региона митохондриального генома и ядерного с-тос гена для определения филогенетического родства тетеревиных птиц.

Научная новизна работы.

Впервые проведен детальный всесторонний филогенетический анализ родства птиц семейства тетеревиных на основе данных как о быстро эволюционирующих, так и относительно медленно эволюционирующих генов митохондриального генома, а также на основе данных о полиморфизме нуклеотидных последовательностей гена с-тос ядерного генома. В работе рассмотрены родство гена цитохрома b внутри этого семейства, а на основе данных о полиморфизме нуклеотидных

последовательностей левого домена контрольного региона митохондриального генома – внутривидовые отношения исследуемой группы птиц. Впервые определены нуклеотидные последовательности гена цитохрома b для *Tetrao urogalloides*, *Lagopus lagopus*, *Bonasa bonasia*, *Falci pennis falci pennis* из разных регионов России, нуклеотидные последовательности для левого домена контрольного региона митохондриальной ДНК и с-мос гена ядерного генома тетеревиных. Впервые проведен детальный анализ структуры гена цитохрома b митохондриального генома и его системы кодирования для птиц семейства тетеревиных.

Научно-практическое значение.

Данные о нуклеотидных последовательностях исследованных нами генов с-мос ядерного, цитохрома b и левого домена контрольного региона митохондриального геномов тетеревиных внесены в международную базу данных. Молекулярно-генетическая характеристика филогенетических взаимоотношений тетеревиных птиц на основе данных о нуклеотидных последовательностях трех генов митохондриального и ядерного геномов может служить хорошим наглядным примером использования молекулярных данных для решения спорных таксономических вопросов. Предпринятая попытка оценить время дивергенции тетеревиных имеет существенное значение для понимания межконтинентального фаунистического обмена и роли Беренгии в формировании современной орнитофауны.

На защиту выносятся

- результаты биохимического и генетического анализа гена цитохрома b митохондриального генома у тетеревиных птиц ;
- результаты филогенетического анализа митохондриальных генов - цитохром b и контрольный регион (левый домен) и с-мос гена ядерного генома;
- оценка времени дивергенции тетеревиных птиц, полученная на результатах анализа синонимичных замен в гене цитохрома b митохондриального генома тетеревиных птиц.

Апробация работы.

Основные положения диссертации доложены на научных сессиях Института Биологических проблем Севера ДВО РАН (Магадан, 1999, 2000), 7-ой Международной научно-практической конференции аспирантов, соискателей и молодых исследователей "Идеи, гипотезы, поиск..."(2000), XI Международной конференции " Актуальные проблемы изучения и охраны птиц Восточной Европы и Северной Азии" (Казань, 2001 г.).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, 1 работа находится в печати.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 126 страницах компьютерной верстки, состоит из разделов: Введение, Литературный обзор, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Приложения. Диссертация содержит 21 рисунок,

19 таблиц. Список цитированной литературы содержит 19 отечественных и 127 иностранных источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом для исследования служили кровь, мышечная ткань, зафиксированные в 70 % этаноле на месте сбора материала, а также перья птиц семейства тетеревиных отряда куриных.

Выделение ДНК. Тотальную ДНК из мышечной ткани, крови и перьев выделяли с использованием метода, включающего обработку клеток лизирующим раствором, содержащим 10 mM Трис- HCl (pH 7,5), 25 mM ЭДТА, 75 mM NaCl , 1% додецилсульфата натрия и протеиназу К в концентрации 0,2 мг/мл, при 55°C в течение 12-16 часов и депротеинизацию 1/3 от общего объема насыщенным раствором NaCl , с дальнейшей преципитацией ДНК изопропанолом, промыванием молекул 70% этанолом и растворением в Трис-ЭДТА буфере при 65° С в течение часа. В некоторых случаях для выделения ДНК из кусочков мышечной ткани использовался IsoQuick Nucleic Acid Extraction Kit (ORCA Research Inc., U.S.A.). В этих случаях ткань весом около 2 мг была помещена в 310 мкл буфера (100mM Трис- HCl (pH 8.0), 10 mM ЭДТА, 100 mM NaCl) с добавлением 15 мкл 10% додецилсульфата натрия и 25 мкл протеиназы К с концентрацией 20 мг/мл и инкубирована в термостате с вращающимся ротором при температуре 55°C в течение 2 часов. Дальнейшее выделение ДНК проводили согласно инструкциям фирмы производителя кита.

Полимеразная цепная реакция и секвенирование. Участки мт ДНК амплифицировали в полимеразной цепной реакции с использованием пар олигонуклеотидных праймеров, последовательности которых приведены ниже. Для уменьшения процента вероятности амплификации ядерной копии гена цитохрома b и контрольного региона митохондриального генома у тетеревиных был использован набор праймеров: A и DDL, позволяющий получить амплимер длиной 3500 п.н. Реакции проводили в 50 мкл смеси, содержащей около 300 нг тотальной ДНК, 25 пмол каждого праймера, 350 мкМ каждого нуклеотида и 2 единицы термостабильной Taq и Pwo ДНК полимеразы (Expand TM Long template PCR System, Boehringer Mannheim). Конечная концентрация MgCl_2 в растворе составляла 2,25 mM. После предварительной денатурации при 94 °C в течение 2 минут амплификацию проводили в течение 30 циклов в следующем режиме: денатурация 94°C - 10 секунд, отжиг 50°C - 30 секунд, наращивание цепи 68°C - 2,5 минуты; после первых 10 циклов температура отжига была увеличена до 55°C, а время наращивания цепи увеличивалось с каждым циклом на 20 секунд и было максимальным в последнем 30 цикле амплификации. Количество и качество амплимеров анализировали электрофоретически в 1% агарозных гелях, окрашенных бромистым этидием, с детекцией в УФ-свете. 7 мкл реакционной смеси после амплификации было использовано в качестве матрицы для секвенирования. Для очистки продуктов амплификации от праймеров и нуклеотидов после первой реакции были использованы экзонуклеаза I (10 единиц) и алкалинфосфатаза креветки (2 единицы; PCR Product Pre-sequencing Kit, Amersham Life Science).

Для циклического секвенирования очищенных продуктов амплификации использовался AmpliCycle™ Sequencing KIT (Perkin Elmer). Рабочий раствор общим объемом 30 мкл содержал 3 мкл очищенного амплимера; 20 пмоль праймера HLB; 1,5 мкмоль $\text{Ci} [\alpha\text{-}^{33}\text{-P}] - \text{dNTP}$; 4 мкл раствора cycle sequencing mix (10X концентрации, включающего реакционный буфер и дезоксирибонуклеотиды), вода. Рабочий раствор был распределен в 4 пробирки, содержащих по 2 мкл дидеоксирибонуклеотидов. Циклическое секвенирование проводили в течение 30 циклов при 55°C, 30 секунд; 72°C, 60 секунд; 93°C, 30 секунд. Разделение продуктов реакции проводилось с использованием электрофореза в 6% полиакриламидном геле.

Нуклеотидные последовательности контрольного региона мт ДНК у *Lagopus leucurus*, *Dendragapus canadensis*, *Dendragapus francilini*, *Bonasa umbellus* были определены методом флуоресцентного мечения двухцепочечных продуктов ПЦР с их последующим разделением на автоматическом секвенаторе ALFred DNA Autosequencer (Pharmacia) в соответствии с рекомендациями фирмы - изготовителя. Для амплификации левого домена контрольного региона мт ДНК у вышеперечисленных таксонов был использован другой набор праймеров: L16760.ra1 и AVEH476.ra1. Реакции проводили в 50 мкл смеси, содержащей 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 25 пмоль каждого праймера, 350 мкМ каждого нуклеотида, 300 нг тотальной ДНК и 2 единицы термостабильной TAKARA Ex Taq™ (TAKARA, Biotechnology). Амплификацию проводили в течение 30 циклов с температурным режимом 95°C, 15 секунд; 55°C, 30 секунд; 72°C, 60 секунд. Продукты амплификации анализировали электрофоретически в 1 % агарозных гелях с детекцией в УФ-свете после окрашивания гелей бромистым этидием. Двухцепочечные продукты ПЦР были очищены на колонках Mullipore (0,45µm Ultrafree-MC unit with the low binding Durapore membrane). Циклическое секвенирование проводилось в ДНК процессоре (DNA Processor, Pharmacia L.K.B.Co. Ltd) с реакционной смесью Thermosequenase cycle sequencing kit (Amersham). В качестве секвенирующих применялись праймеры, которые были использованы для первого раунда амплификации. Циклическое секвенирование проводили в течение 20 циклов при 95°C, 30 секунд; 65°C, 30 секунд. Разделение продуктов реакции проводилось с использованием электрофореза в 6% полиакриламидных гелях на ALFred DNA Autosequencer (Pharmacia Co. Ltd) в режиме автоматического сканирования гелей и компьютерной записи нуклеотидных последовательностей.

Реакцию полимеразной цепной реакции участка гена c-mos ядерного генома птиц семейства Tetraonidae проводили в 50 мкл смеси, содержащей 2 пмоль каждого праймера, 0,2 mM каждого нуклеотида, 100 нг тотальной ДНК и 1 единицу термостабильной AGS Taq полимеразы; конечная концентрация MgCl_2 в растворе составляла 3,5 mM. После предварительной денатурации ДНК при 93°C в течение 3 минут, амплификацию проводили в течение 35 циклов с температурным режимом 93°C, 10 секунд; 50°C, 45 секунд; 72°C, 60 секунд; после первых 10 циклов температура отжига была увеличена до 52 °C. Анализ количества и качества амплимеров, их очистку от

праймеров и нуклеотидов, а также реакцию циклического секвенирования проводили аналогично реакциям, описанным нами ранее для цитохрома b и контрольного региона Tetrao urogallus, Tetrao urogalloides, Bonasa bonasia, Lagopus lagopus, Lagopus mutus.

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей контрольного региона мт генома использовалась программа CLUSTAL W (Thompson et al., 1994). Выравнивание нуклеотидных последовательностей генов: цитохром b и c-mos проводилось вручную.

Праймеры (5' - 3' направление), используемые для амплификации гена цитохрома b и контрольного региона:

Mt-A (L-14995) CTCCCAGCCC CATCCAACAT CTCAGCATGA TGAAACTTCG

Mt-DDL (H-1816) GCACCGCCAAGTCCTTAGAGTT ;

для секвенирования гена цитохрома b

Mt-B (H-15298) TTG TGA TTA CTG TAG CAC CTC AAA ATG ATA TTT GTC CTC

Mt-G (L-15180) CWT CCT TMT TCT TCA TCT GCA TCT AC

Mt-C (L-15320) TAY GTC CTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA TTC TGA GG

Mt-D (L-15578) AAA ATC CCA TTC CAC CCC TAC TAC TCC ACA AAA GA

Mt-Fs (H-15917) TAG TTG GCC AAT GAT GAT GAA TGG GTG TTC TAC TGG TT

Mt-H (L-15722) CCY CCA CAC ATC AAA CCM GAA TTGA TAC TTC CTA TT.

Нумерация позиций нуклеотидов соответствует нуклеотидной последовательности мт ДНК цыпленка (Desjardins and Morais). Буквы "L" и "H" обозначают легкую и тяжелую цепи мт ДНК, соответственно.

L16760.ra1 GACTACGGCTTGAAAAGCCATTGTTGT

AVEN476.ra1 GTGAAAAGTGAGAAAAGTTCAGGAGTTA

Для секвенирования контрольного региона

Mt-HLB (H-519) GGCCCTGACATAGGAACCAGAGG

AVEN476.ra1 GTGAAAAGTGAGAAAAGTTCAGGAGTTA

Нумерация позиций нуклеотидов соответствует нуклеотидной последовательности мт ДНК цыпленка (Desjardins and Morais). Буквы "L" и "H" обозначают легкую и тяжелую цепи мт ДНК, соответственно.

Праймеры для амплификации и секвенирования c-mos гена ядерного генома любезно предоставлены профессором Хелбигом (A. Helbig, Universitat, Greifswald). Информация о размере секвенированных участков генома тетеревиных приведена в таблице 1.

Филогенетический анализ полученных данных о нуклеотидных последовательностях выполняли с помощью пакетов филогенетических программ MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 1.02 (Kumar et al., 1993) и PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1989), PUZZEL (Strimmer K. and von Haeseler, 1997), PAUP 3.1.1 (Swofford, 1993). Генетические дистанции между индивидуальными последовательностями оценивались с использованием 2-параметрической модели Кимуры.

Таблица 1.

Размер секвенированных участков генома у изученных видов тетеревиных птиц.

Видовое название и коллекционный номер	Место сбора материала	Размер секвенированного участка генома (п.н.)		
		Митохондриальный геном		Ядерный геном
		Цитохром b	Контрольный регион	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes jac</i>	Якутия	700	402	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 269</i>	Хабаровский край	1020	383	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 17</i>	Магаданская область	390	402	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 15</i>	Магаданская область	700	402	660
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 14</i>	Магаданская область		402	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 08</i>	Магаданская область		402	
<i>Tetrao urogalloides urogallodes 18</i>	Магаданская область		402	
<i>Tetrao urogalloides kamtschaticus KK</i>	Камчатка		383	
<i>Tetrao urogalloides kamtschaticus 1151</i>	Камчатка	1020	383	
<i>Tetrao urogallus major 1</i>	Европа	1020	401	660
<i>Tetrao urogallus major 2</i>	Европа	700		
<i>Tetrao urogallus volgensis 1864</i>	Свердловская область		401	
<i>Tetrao urogallus longbergi 2147</i>	Мурманская область		400	
<i>Lagopus lagopus scoticus 083</i>	Шотландия	1020		
<i>Lagopus lagopus scoticus 084</i>	Шотландия	1020		
<i>Lagopus lagopus lagopus 3</i>	Магаданская область		385	
<i>Lagopus lagopus lagopus 441</i>	Магаданская область	1020		
<i>Lagopus lagopus lagopus 1080</i>	Якутия	275		
<i>Lagopus lagopus lagopus 200</i>	Мурманская область	700		
<i>Lagopus mutus pleskei 444</i>	Магаданская область	1020	395	660
<i>Lagopus mutus pleskei 6103</i>	Магаданская область		395	
<i>Lagopus mutus nelsoni 712</i>	Аляска		395	
<i>Lagopus leucurus 996</i>	Вашингтон	700	468	660
<i>Falci pennis falci pennis 3</i>	Хабаровский край	1020		
<i>Falci pennis falci pennis 323</i>	Хабаровский край			660
<i>Dendragapus canadensis 1</i>	Аляска	700		
<i>Dendragapus canadensis 569</i>	Аляска		463	660
<i>Dendragapus francilini 1009</i>	Вашингтон	700	410	
<i>Dendragapus francilini 1</i>	Вашингтон			660
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 552</i>	Красноярский край		395	
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 553</i>	Красноярский край	1020	395	
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 554</i>	Красноярский край		395	
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 555</i>	Красноярский край		395	
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 556</i>	Красноярский край		395	
<i>Bonasa bonasia septentrionalis 557</i>	Красноярский край		395	
<i>Bonasa bonasia kolymensis P3</i>	Магаданская область			660
<i>Bonasa bonasia kolymensis P4</i>	Магаданская область	700	401	
<i>Bonasa bonasia kolymensis P5</i>	Магаданская область		401	
<i>Bonasa bonasia kolymensis 4</i>	Магаданская область		401	
<i>Bonasa bonasia kolymensis 18</i>	Магаданская область		401	
<i>Bonasa bonasia yamashinai 301</i>	Сахалинская область		401	
<i>Bonasa bonasia yamashinai 307</i>	Сахалинская область	1020	401	
<i>Bonasa bonasia yamashinai 323</i>	Сахалинская область		401	
<i>Bonasa bonasia yamashinai P1C</i>	Сахалинская область		402	
<i>Bonasa bonasia yamashinai P2C</i>	Сахалинская область		402	
<i>Bonasa umbellus 5129</i>	Вашингтон	1020	513	660

Филогенетические деревья построены с использованием алгоритмов NJ (ближайшего соседа), UPGMA, максимальной экономии (невзвешенной и взвешенной с использованием эвристического алгоритма поиска; соотношение трансверсий к транзициям как 5 : 1) и максимального правдоподобия. Достоверность филогенетических деревьев оценивалась с помощью бутстрэп анализа. Индексы бутстрэпа соответствуют доле деревьев (в процентах) от общего их числа, генерируемого при осуществлении 100 операций бутстрэпа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Биохимический и генетический анализ участка гена цитохрома b (700 п.н.) митохондриального генома тетеревиных птиц. Проведен анализ секвенированной последовательности гена цитохрома b длиной 700 п.н. 10 видов и 7 подвидов, представляющих 4 рода тетеревиных птиц: Tetrao, Lagopus, Falcipennis, Bonasa. Анализ показал, что из выявленных 182 переменных сайтов, равномерно распределенных по всей длине участка гена цитохрома b длиной 700 п.н., только 140 парсимонно информативны. Большинство из этих замен являются синонимичными. Из 233 аминокислот, кодируемых 700 п.н., выявлены замены для восемнадцати, тринадцать из которых парсимонно информативны. Анализируя данные о локализации переменных позиций аминокислот, кодируемых геном цитохрома b четырех родов тетеревиных, можно сделать вывод о расположении этих замен, в основном, внутри трансмембранного сегмента. Поэтому данный участок генома характеризуется значительным накоплением мутаций в третьих положениях кодонов (83,51 %), которые, как правило, являются молчащими. Мутации, возникающие в первых и вторых положениях кодонов, немногочисленны 16,48% (13,18 % и 3,3 % соответственно) и играют более значительную роль для всей окислительной системы в целом. Транзиционные замены происходят в третьих положениях кодонов в два-четыре раза чаще, чем трансверсии. Нуклеотидный состав исследуемого участка митохондриальной ДНК в третьих положениях кодонов значительно смещен относительно содержания гуанина, в среднем составляющего 3,2%, и цитозина - 46,6%. Вторые положения кодонов гена цитохрома b у изученных видов птиц богаты тиминем (37,3 %). Значительных отклонений в содержании нуклеотидов для первых положений кодонов не наблюдалось. Величины смещения в нуклеотидном составе гена цитохрома b четырех различных азотистых оснований для первых, вторых, третьих положений кодонов показывают, что наибольшее значение (0,427) характерно для третьего положения и наименьшее (0,033) – для первых позиций. Величина отклонения в содержании цитозина в третьем положении кодонов существенна и составляет 2,14. Меньше, но также достаточно велико отклонение в содержании тимина (2,0), наблюдаемое для третьих положений кодонов (табл. 2). Наименьшее значение среднего стандартного отклонения было получено для вторых позиций, которые играют наиболее важную роль в кодировании и менее переменны.

Таблица 2.

Нуклеотидный состав (%) в первых, вторых и третьих положениях кодонов гена цитохрома b у тетеревиных птиц.

Цитохром b (700 п.н.)	A1	T1	C1	G1	A2	T2	C2	G2	A3	T3	C3	G3
Среднее значение	23,5	24,7	27,5	24,3	19,8	37,3	29,4	13,6	34,9	14,2	46,6	3,2
Стандартное отклонение	0,44	0,83	0,84	0,35	0,28	0,39	0,23	0,14	0,93	2,0	2,14	0,84
Среднее стандартное отклонение	0,615				0,258				1,47			
Смещение	0,033				0,2196				0,427			

* Величина смещения = $(2/3) \sum_{i=1}^4 |f_i - 0,25|$, где f_i – частота встречаемости аденина, гуанина, тимина, цитозина.

Учитывая то, что трансверсии в третьих позициях кодонов гена цитохрома b в меньшей степени, чем транзиции, подвержены влиянию гомоплазий, и, в частности, у млекопитающих имеют почти линейную тенденцию к росту в течение 80 млн. лет, мы проследили зависимость роста количества трансверсий и транзиций в третьем положении кодона между парами видов. Трансверсии в третьих позициях гена цитохрома b у тетеревиных птиц имеют также почти линейную тенденцию к росту, а тенденция к снижению количества транзиций в третьих положениях кодонов наблюдается лишь после 16 трансверсий, за исключением пар видов *Bonasa bonasia* и *Bonasa umbellus*, наиболее дивергированных таксонов. Соотношение транзиция/трансверсия колеблется от двух до восьми. Наблюдаемая картина динамики накопления транзиций в третьих положениях кодонов со временем может быть существенно искажена влиянием эффекта насыщения.

2. *Эволюция гена цитохрома b у птиц отряда куриных.* Для уточнения филогенетического положения птиц семейства тетеревиные в отряде куриных проведен анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохрома b митохондриального генома. Нами был секвенирован ген цитохрома b длиной 1020 п.н. у семи видов, шести подвидов, представляющих четыре рода: *Tetrao*, *Lagopus*, *Falci pennis*, *Bonasa* семейства тетеревиных птиц. Учитывая информацию о наличии у птиц ядерных копий гена цитохрома b мт ДНК длиной 320 п.н., мы постарались избежать этой проблемы, амплифицировав протяженный участок мт генома (около 3500 п.н.). Таким образом, была уменьшена вероятность амплификации ядерных копий. Кроме того, мы использовали различные праймеры для секвенирования, благодаря чему получали “перекрывающуюся” информацию о нуклеотидных последовательностях. Из 340 аминокислот, кодируемых 1020 п.н., выявлены замены для 27, из которых 15 парсимонно информативны. Наибольшая величина смещения выявлена для аминокислоты лейцин (L), которая может быть кодирована шестью различными кодонами. Кодон CUC, кодирующий лейцин,

встречается в 2,48 раза чаще, чем остальные синонимичные. Данный участок генома характеризуется значительным накоплением мутаций в третьих положениях кодонов (85,7%), которые, как правило, являются молчащими, тогда как мутации, возникающие в первых и вторых положениях кодонов, немногочисленны (12,8% и 1,43% соответственно). Наиболее часто встречаются транзиции типа цитозин-тимин и более редко трансверсии типа цитозин-гуанин. Нуклеотидный состав исследуемого участка митохондриальной ДНК в третьих положениях кодонов у тетеревиных строго смещен относительно содержания гуанина, в среднем составляющего 3,4% и цитозина - 45,8% (табл. 3). Для третьих положений кодонов характерны самая высокая величина смещения (0,42) в нуклеотидном составе, положительное значение АТ отклонения (0,4) и отрицательное значение GC отклонения (-0,86). Возможно, значительное содержание А (35,8 %) в третьих положениях кодонов мт ДНК отражает неслучайное увеличение количества синонимичных кодонов для четырехждывырожденных аминокислот: аланин (GCN), глицин (GGN) и валин (GTN) в гене цитохрома b. Вторые положения кодонов гена цитохрома b у изученных видов птиц богаты тиминотом (40,6 %). Значительных отклонений в содержании нуклеотидов для первых положений кодонов не наблюдалось. Величины смещения в нуклеотидном составе гена цитохрома b 4 различных азотистых оснований для первых, вторых, третьих положений кодонов показывают, что наибольшее значение (0,42) характерно для третьего положения и наименьшее (0,074) - для первых позиций.

Таблица 3.

Нуклеотидный состав (%) в первых, вторых и третьих положениях кодонов у изученных видов тетеревиных птиц в митохондриальном гене цитохрома b.

Цитохром b (1020 п.н.)	Средняя величина нуклеотидного состава %				Величина смещения*	Адеини-тимининовое отклонение ^b	Гуанин-цитозиновое отклонение ^c
	аденин	тимин	цитозин	гуанин			
Первое положение кодонов	23,3	23,5	30,6	22,6	0,074	-0,004	-0,15
Второе положение кодонов	19,1	40,6	27,3	13,0	0,238	-0,36	-0,354
Третье положение кодонов	35,8	15,1	45,8	3,4	0,42	0,40	-0,86
Среднее	26,0	26,4	34,5	13	0,15	-0,007	-0,45

*Величина смещения = $(2/3) \sum_{i=1}^4 |f_i - 0,25|$, где f_i – частота встречаемости аденина, гуанина, тимина, цитозина; ^b аденин-тимининовое (АТ) отклонение = $(A-T)/(A+T)$, ^c гуанин-цитозиновое (GC) отклонение = $(G-C)/(G+C)$

Согласно теории Фриза (Freese, 1962) и Суеoka (Sueoka, 1962), содержание GC% в ДНК определяется “сдерживающими” селективными процессами эволюции и мутационным гуанин-цитозининовым прессингом (μ_D). Влиянием мутационного прессинга на формирование нуклеотидного состава можно также объяснить различную скорость замен гуанина или цитозина на аденин или тимин, или аденина или тимина на гуанин или цитозин. Для вычисления мутационного прессинга (μ_D) на ген цитохрома b у тетеревиных птиц нами был использован подход, описанный Джерминивом (Jermin, 1994). Процентное содержание гуанина-цитозина в несинонимичных позициях кодонов гена цитохрома b у тетеревиных птиц, то есть в первой и

второй, коррелируют с величиной мутационного прессинга, а именно процентным содержанием гуанина-цитозина в третьих синонимичных позициях. Величина гуанина-цитозинового мутационного прессинга на нуклеотидный состав гена цитохрома b мт генома тетеревиных птиц колеблется от $0,458 \pm 0,026$ до $0,516 \pm 0,026$. Согласно Джермину, при $0,5 < \mu_D \leq 1$ нуклеотидный состав исследуемого гена находится под гуанин-цитозиновым мутационным прессингом; в случае $0,0 \leq \mu_D < 0,5$ на нуклеотидный состав оказывает воздействие аденин-тиминовый мутационный прессинг. Можно считать проведенный нами анализ показал, что на нуклеотидный состав гена цитохрома b мт генома тетеревиных птиц действует как гуанин-цитозиновый прессинг в случае *Lagopus lagopus*, *Falci pennis falci pennis* и *Bonasa umbellus*, так и аденин-тиминовый прессинг в случае нуклеотидных последовательностей *Tetrao urogalloides* и *Bonasa bonasia*. Влияние гуанин-цитозинового прессинга на нуклеотидный состав митохондриального генома возможно объясняется особенностями репликации, например, высокой асимметричностью или дефектами γ полимеразы, участвующей в репликации. На сегодняшний день пока не известны ни причины систематических колебаний содержания GC% в нуклеотидных последовательностях гена цитохрома b мт генома, ни возможные механизмы воздействия аденин-тиминового мутационного прессинга.

Для решения вопроса о филогенетическом родстве таксонов мы считаем целесообразным сопоставить дендрограммы, построенные разными методами. Схемы филогенетического родства отряда куриных птиц были построены методами максимальной экономии, максимального правдоподобия и ближайшего соседа с использованием полученных нами данных о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома b представителей 6 видов, 6 подвидов, представляющих 4 рода семейства тетеревиных, а также по данным Корнеги (Kornegay, 1993), Кимбалл (Kimball, 1997) и Ранди (Randi, 1996) о последовательности этого же гена для 17 видов семейства фазановых, 1 вида семейства индейковых и чачалаки как внешней группы. Информация о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома b куриных птиц: *Ortalis vetula*, *Numida meleagris*, *Lophura nycthemera*, *Pavo cristatus*, *Pavo mutic*, *Meleagris gallopavo*, *Alectoris chukar*, *Coturnix coturnix*, *Gallus gallus*, *Alectoris barbara*, *Alectoris melanoccephala*, *Alectoris magna*, *Alectoris rufa*, *Alectoris philbyi*, *Francolinus francolinus*, *Tragopan temminckii*, *Lophophorus impejanus* была получена из банка генов данных. При изучении филогенетических связей тетеревиных и фазановых была использована информация о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома b представителей только тех видов семейства фазановых, которые по мнению зоологов, являются наиболее вероятными предками тетеревиных. Например, по мнению Потапова (1985), характер шиткования плюсны – строгого филогенетического маркера у тетеревиных птиц - схож с характером шиткования плюсны у следующих родов фазановых: *Tetraophasis*, *Lerwa*, *Arborophila*, *Lophophorus*, *Tragopan*, *Tetraogallus*, *Alectoris*. Снигиревский С. И. (Кузьмина, 1977) считал, что становление тетеревиных могло произойти в период расцвета тургайской флоры, широко

распространенной в третичное время в Европе, Азии и Северной Америке, а наиболее вероятным из ближайших родственников тетеревиных могла быть серая куропатка. По данным анализа ядерного генома тетеревиные и индюк являются близкородственными таксонами, которые имели в относительно недавнем прошлом общего предка (Helm-Bychowski and Wilson, 1986; Sibley and Ahlquist, 1990), что противоречит эколого-морфологическим данным Джонсгарда (Johnsgard, 1983), выделяющего индюка и тетеревиных в отдельные самостоятельные ветви. Нами было построено пять дендрограмм родства курообразных птиц. Дендрограммы построены методами максимального правдоподобия (ML), максимальной экономии (MP) и ближайшего соседа (NJ). Для построения дендрограмм родства методом максимального правдоподобия использовались пакеты программ PHYLIP 3.5c (Felsenstein, 1989) и PUZZEL (Strimmer and von Haeseler, 1997) с использованием HKY 85 модели. HKY 85 модель учитывает нуклеотидный состав исследуемого гена, разную степень вероятности появления транзиций, трансверсий, и является одной из лучших среди моделей, описывающих характер появления нуклеотидных замен (Page and Holman, 1998). Индексы бутстрэпа соответствуют доле деревьев (в процентах) от общего их числа, генерируемого в результате осуществления 100 реплик бутстрэпа. Во всех случаях построения дендрограмм родства вид *Ortalis vetula* использовался в качестве внешней группы. Для примера на рисунке 1 приведена дендрограмма филогенетического родства гена цитохрома b курообразных птиц, построенная методом максимального правдоподобия (программа PUZZEL (Strimmer and von Haeseler, 1997)); HKY-модель; α параметр = 0,4 γ распределения; *Ortalis vetula* – внешняя группа). Виды, нуклеотидные последовательности которых секвенированы нами, отмечены звездочками. Как видно из дендрограммы, наиболее вероятным из близких сестринских таксонов и разделяющим с тетеревиными общего предка является индюк (*Meleagris gallopavo*), а не серая куропатка (*Perdix perdix*), что противоречит гипотезе Снигиревского. Полученные оценки величин бутстрэп - анализ при построении дендрограмм позволяют сделать вывод о том, что полученный результат является достаточно достоверным.

На сегодняшний день не существует единого мнения о точном времени обособления семейства тетеревиных. В настоящей работе были использованы два подхода для установления времени дивергенции на основе молекулярно - генетических данных. По данным Эвайза (Avice, 1994), скорость эволюции митохондриального генома, в том числе гена цитохрома b, составляет около 2% нуклеотидных замен за 1 млн. лет. Используя эти “стандартные часы эволюции” мт генома можно предполагать, обособление птиц семейства тетеревиных от предковой формы произошло в миоцене. С другой стороны, по данным о скорости возникновения синонимичных замен (Pesole et al., 1999) можно сделать вывод, что семейство тетеревиных дивергировало от предковой формы значительно позже, в позднем плиоцене. Полученные оценки времени дивергенции семейства тетеревиных от предковой формы являются достаточно приблизительными и противоречивыми и требуют дополнительного изучения.

Рисунок 1. Дендрограмма родства гена цитохрома b митохондриального генома курообразных птиц.

3. *Филогенетическое родство гена цитохрома b у тетеревиных птиц.* Нами был секвенирован участок гена цитохрома b длиной 700 п.н. у птиц семейства тетеревиные, в том числе виды и подвиды, не секвенированные ранее Элсвортом (Ellsworth et al., 1996), и построены схемы методами невзвешенной максимальной экономии (MP), ближайшего соседа (NJ) с использованием программы MEGA 1.02 (Kumar et al., 1993) и максимального правдоподобия (ML) с применением программы PUZZEL (Strimmer and von Haeseler, 1989), используя НКУ модель, α параметр γ - распределения равен 0,4. *Gallus gallus* – внешняя группа. Полученные филогенетические схемы родства тетеревиных птиц в целом соответствуют древу, предложенному Потаповым (Потапов, 1985) на основании морфо-экологических критериев. Три вида рода *Lagopus* образуют один монофилитический кластер в отличие от дендрограммы родства, предложенной Элсвортом (Ellsworth et al., 1996) и существенно отличаются от филогенетического древа Джонсгарда (Johnsgard, 1983), основанного на данных экологии. Для примера, на рисунке 2 приведена дендрограмма родства фрагмента гена цитохрома b длиной 700 п.н. мт генома у тетеревиных, построенная методом ближайшего соседа (NJ) с применением 2-х параметрической модели Кимуры. При сопоставлении данных о нуклеотидных последовательностях участка гена цитохрома b у видов, секвенированных нами и Элсвортом (Ellsworth et al., 1996), было выявлено значительное количество нуклеотидных различий, в частности, у *Bonasa umbellus* (от 7 до 11) и у *Lagopus mutus* (до 12 нуклеотидных различий). Подобное несоответствие может быть объяснено двояко: возможно, что образцы нуклеотидных последовательностей, которые были секвенированы Элсвортом и нами, были взяты у представителей различных отдаленных популяций или подвидов. С другой стороны, не исключается возможность амплификации и секвенирования ядерной копии гена цитохрома b американскими учеными. К сожалению, в статье Элсворта (Ellsworth et al., 1996) не приводятся точные данные о месте коллекционирования образцов, и мы лишены возможности проверить наше первое предположение. Исследователи Гутьеррес, Барровклоуф, Гроф (R. J. Gutierrez, George F. Barrowclough, Jeffrey G. Groth, 2000) секвенировали пять генов мт генома: полный ген цитохрома b, цитохром - оксидазы-3, аденозинтрифосфатазы 8, аденозинтрифосфатазы 6, NADH дегидрогеназы 2. Этими учеными предложены схемы филогенетического родства нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохрома b размером 609 п.н., то есть аналогичного участка генома, секвенированного Элсвортом (Ellsworth et al., 1996), целого гена цитохрома b длиной 1143 п.н. и пяти генов мт ДНК. В обоих случаях при анализе нуклеотидных последовательностей целого гена или его участка, виды *L. mutus*, *L. lagopus* и *L. leucurus* не образуют монофилитический кластер, что согласуется с данными Элсворта (Ellsworth et al., 1996), но противоречит нашим выводам (рис. 2) и выводам о филогенетическом родстве нуклеотидных последовательностях 4 генов мт генома (цитохрома b, 16S рРНК, 12S рРНК, NADH 2 дегидрогеназы), полученных Хоглюндом (Hoglund, персональное сообщение), а также собственным данным авторов (R. J. Gutierrez et al., 2000) о монофилитическом родстве

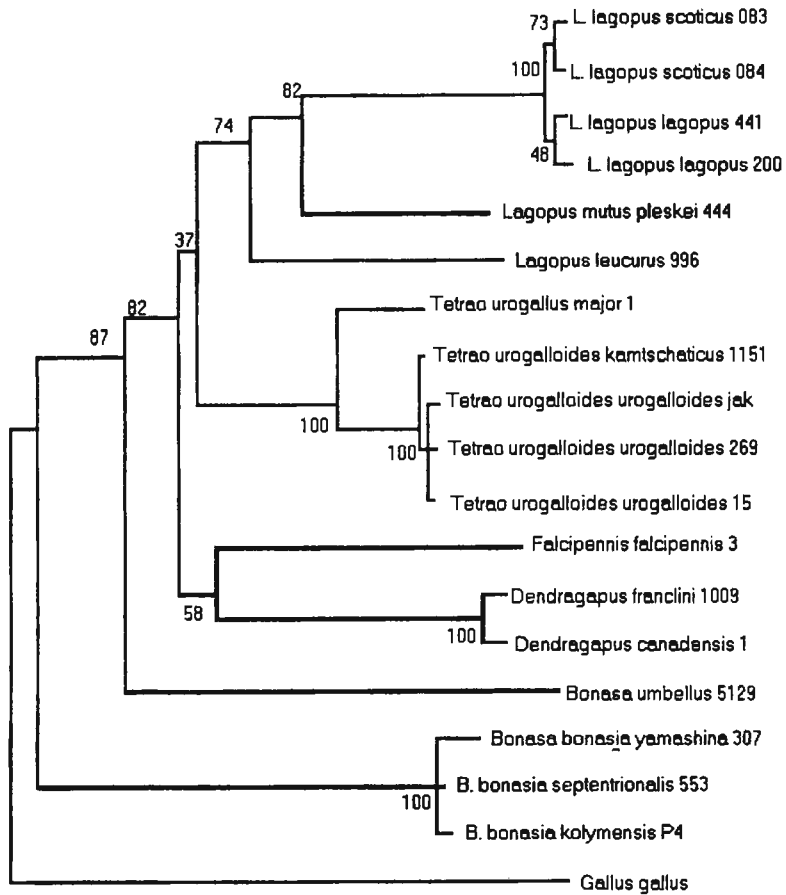


Рисунок 2. Дендрограмма родства фрагмента гена цитохрома b длиной 700 п.н. мт генома, построенная методом ближайшего соседа (NJ). Программа MEGA 1.02; генетические дистанции оценивались с использованием 2-х параметрической модели Кимуры. Указаны индексы (в процентах) бутстрэп-анализа.

нуклеотидных последовательностей 5 генов мт генома (цитохрома *b*, цитохромоксидазы - 3, аденозинтрифосфатазы 8, аденозинтрифосфатазы 6, NADH дегидрогеназа 2) у трех видов рода *Lagopus*. Подобное несоответствие, на наш взгляд, можно объяснить недостаточной информативностью небольшого фрагмента гена цитохрома *b* для построения филогенетических дендрограмм родства существенно отдаленных, сильно дивергированных видов целого семейства. Для проверки нашего предположения проведено два независимых филогенетических анализа: 1) дополнили наши данные о нуклеотидных последовательностях 10 видов, представляющих 4 рода тетеревиных птиц, данными Элсворта о нуклеотидных последовательностях сходных таксонов и построили филогенетические дендрограммы родства этих птиц. Полученные дендрограммы родства, построенные методами невзвешенной максимальной экономии (MP) и ближайшего соседа (NJ), имели одинаковую топологию со схемами, основанными только на наших данных о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома *b* длиной 700 п.н. и построенных теми же филогенетическими методами (MP, NJ). Генетические дистанции между индивидуальными последовательностями оценивались с использованием 2-параметрической модели Кимуры, исходя из количества нуклеотидных замен на сайт при попарном сравнении. 2) В случае же объединения и использования полученных нами данных и всех данных Элсворта для построения дендрограмм родства разными методами (невзвешенной максимальной экономии, максимального правдоподобия и NJ методом), все полученные схемы филогенетического родства не могут считаться достоверными, поскольку длины ветвей филогенетических древ малы и величины бутстрэп-анализа во многих случаях ниже 50%. Более того, эти схемы не отражают истинное родство тетеревиных. Таким образом, полученные результаты доказывают, что использование данных о нуклеотидных последовательностях небольшого фрагмента гена цитохрома *b* мт генома является недостаточно информативным и не позволяют получить достоверную картину эволюции целого семейства. Недостаточная информативность полного гена цитохрома *b* мт ДНК для построений филогении целого семейства, включая достаточно сильно отдаленные таксоны, вызвана, скорее всего, эффектом насыщения в нуклеотидных последовательностях и эффектом "экранирования" филогенетического сигнала. Для построения филогенетического древа, достоверно отражающего родство таксономических единиц целого семейства, в том числе и тетеревиных, необходимо исследование вариабельности нуклеотидных последовательностей других генов мт ДНК, а также ядерного генома. Другим спорным моментом в филогении тетеревиных птиц является вопрос о таксономическом статусе рябчиков *Bonasa bonasia*, *Bonasa sewerzowi* и *Bonasa umbellus*. По мнению Потапова (Потапов, 1985) различия между палеарктическими (*Bonasa bonasia*, *Bonasa sewerzowi*) и неарктическими (*Bonasa umbellus*) видами, скорее всего, подродового ранга. Тем не менее, многие ученые рассматривают *B. bonasia*, *B. sewerzowi* и *B. umbellus* как представителей двух родов. Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей участка гена цитохрома *b* мт генома тетеревиных позволил нам сделать

вывод о полифилитическом происхождении рябчиков (*B. umbellus* и *B. bonasia*), что согласуется с данными анализа Гутьеррес с соавторами (Gutierrez et al., 2000). До сих пор остается невыясненным вопрос о таксономическом статусе дикуш. По данным морфологии, экологии и этологии род дикуш (*Falcipennis*) – хорошо обособленная от остальных тетеревиных группа птиц, имеющая монофилитический источник происхождения, что согласуется с результатами исследований четырех генов мт генома шведских и немецких ученых (Hoglund, персональное сообщение), но противоречит результатам американских исследователей (Gutierrez et al., 2000). Последние, основываясь на результатах филогенетического анализа нуклеотидных последовательностях пяти генов мт генома, предлагают присвоить самостоятельный родовой статус сибирской дикуше *Falcipennis falcipennis* – палеарктическому виду и американским дикушам *Canachites canadensis* и *Canachites franklinii* – неарктическим видам. Как видно из схемы филогенетического родства, построенной нами на данных о секвенированном участке гена цитохрома *b* длиной 700 п.н. (рис. 2) для 10 видов тетеревиных, дикуши образуют один монофилитический кластер, поэтому мы не согласны с предложением американских исследователей о присвоении американским дикушам отдельного таксономического родowego статуса. К сожалению, на сегодняшний день в банках генетических данных отсутствует какая-либо информация о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома *b* тетеревиных, за исключением *Tympanuchus phasianellus*, и мы не имеем возможности сравнить полученные нами данные о нуклеотидных последовательностях с результатами исследований других ученых. На наш взгляд, для выяснения “истинного” таксономического статуса рода дикуш необходим не только анализ нуклеотидных последовательностей большего количества генов мт генома, но также исследования генов ядерного генома. Интересными с эволюционной точки зрения являются и внутривидовые взаимоотношения тетеревиных птиц, в частности, *Tetrao urogalloides*, *Lagopus lagopus*, *Bonasa bonasia*. На всем протяжении ареала камennyй глухарь демонстрирует сравнительно однородную окраску, размеры и пропорции тела. Исключение составляет только камчатская популяция, резко отличающаяся от всех остальных светлым тоном оперения и размерами и поэтому представляющая самостоятельный подвид *Tetrao urogalloides kamtschaticus*. Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагмента гена цитохрома *b* длиной 700 п.н. у представителей подвида *Tetrao urogalloides urogalloides* из разных мест обитания: - Якутия (одна особь), Хабаровский край (один экземпляр), Магаданская область (два индивида) - выявило одну замену у *Tetrao urogalloides urogalloides* из Магаданской области (одна особь), что подтверждает принадлежность этих птиц к одному подвиду. При сопоставлении данных о нуклеотидных последовательностях гена цитохрома *b* (1020 п.н.) у *Tetrao urogalloides urogalloides* из Хабаровского края и подвида *Tetrao urogalloides kamtschaticus* выявлена также только одна нуклеотидная замена. По мнению Р. Л. Потапова обособление этого подвида произошло в позднем плейстоцене. Полученные нами результаты также свидетельствуют о сравнительно недавнем

происхождении камчатской популяции, а отсутствие нуклеотидных различий на участке гена цитохрома *b* у хорошо морфологически обособленных подвидов возможно объясняется 4 - х кратным замедлением “стандартной” скорости эволюции митохондриального генома теплокровных животных, связанной с изменениями климатических условий в плейстоцене (Avice, 1998; Martin, 1993). При сопоставлении нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* длиной 275 п.н. *Lagopus lagopus* из Магаданской и Мурманской областей нуклеотидных замен не выявлено, тогда как при сопоставлении этих последовательностей с последовательностью у *L. lagopus* из Якутии было выявлено две нуклеотидные замены что, скорее всего, объясняется индивидуальной изменчивостью. Сравнение нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* длиной 1020 п.н. у *L. lagopus scoticus* (2 особи) - резко уклоняющейся островной формы, единственной среди рода и не имеющей белого наряда, и *L. lagopus lagopus* выявило четыре нуклеотидные замены. Степень дивергенции (*P*) составила 0,32%, что соответствует подвидовому уровню. Ареал палеарктического рябчика (*B. bonasia*) охватывает всю бореальную зону Евразии. На основе морфологических и экологических характеристик, а также особенностей поведения Р. Л. Потапов (Потапов, 1985) выделил 11 подвидов рябчика. Колымский подвид рябчика (*B. bonasia kolymensis*) - хорошо обособленная форма, отличающаяся малыми размерами птиц и сильным развитием белого цвета в окраске оперения. Островная сахалинская форма (*B. bonasia yamashinai*) очень близка к колымскому подвиду общей светлой окраской тела, но белого цвета меньше. Ареал третьего подвида (*B. bonasia septentrionalis*) охватывает южную полосу Сибирской тайги от Енисея до низовьев Амура. Общий тон верхней стороны тела пепельно-серый, иногда с легким буроватым оттенком. Сопоставление данных о полиморфизме нуклеотидных последовательностей гена цитохрома *b* длиной 700 п.н. у трех морфологически и экологически хорошо дифференцированных подвидов *B. bonasia kolymensis*, *B. bonasia septentrionalis*, *B. bonasia yamashinai* выявило незначительное количество мутаций от 1 (*B. bonasia kolymensis* и *B. bonasia septentrionalis*) до 5 (*B. bonasia yamashinai* и *B. bonasia kolymensis*). Степень дивергенции (*P*) колеблется от 0,16% (*B. bonasia kolymensis* и *B. bonasia septentrionalis*) до 0,63% (*B. bonasia yamashinai* и *B. bonasia septentrionalis*) и соответствует для подвидового уровня.

4. Внутривидовая изменчивость Д-петли мт генома тетеревиных птиц. Исследования внутривидовой изменчивости гена цитохрома *b* нескольких видов семейства тетеревиные лишь частично позволили ответить на некоторые спорные вопросы филогении этих птиц. Анализ нуклеотидной последовательности левого домена контрольного региона – одного из наиболее вариабельных участков мт ДНК - позволяет анализировать филогенетические отношения организмов на более низких таксономических уровнях таких, как подвид и популяция, и является одним из лучших кандидатов для подобных целей. Нами было проведено исследование внутривидовой изменчивости подвидов *Tetrao urogalloides urogalloides*, представленного пятью индивидами из Магадана, одним из Якутии и одним индивидом из Хабаровского края, и *Tetrao*

urogalloides kamtschaticus (две особи с Камчатки). Количество нуклеотидных замен в контрольном регионе превышает таковые в гене цитохрома *b*, что еще раз подтверждает вывод о быстрой эволюции этого участка мт генома. С другой стороны, отсутствие или очень малое количество (одна замена) различий в нуклеотидных последовательностях левого домена контрольного региона у двух морфологически и экологически различных подвидов *Tetrao urogalloides urogalloides* (из Магаданской области и Якутии) и *Tetrao urogalloides kamchaticus* может быть объяснено несколькими факторами: 1) многократными заменами в “горячих” и “полугорячих” сайтах быстро эволюционирующей нуклеотидной последовательности левого домена контрольного региона, что лишает нас возможности зафиксировать все замены и проследить истинный или близкий к истинному путь эволюции этих нуклеотидных последовательностей; 2) с другой стороны можно предположить, что эволюция мт и ядерного геномов протекала несогласованно что, на наш взгляд, подтверждается данными об отсутствии нуклеотидных замен как в быстро эволюционирующем участке мт ДНК (контрольный регион), так и относительно медленно эволюционирующем (ген цитохрома *b*) у недавно дивергировавших таксонов. Интересным является факт выявления значительного количества нуклеотидных замен (7-8) в исследуемом участке мт генома у особей одного подвида *Tetrao urogalloides urogalloides* из разных мест обитания (из Магаданской области, Якутии и Хабаровского края), что предполагает значительную степень дивергенции этих хорошо обособленных популяций. Ввиду того, что нами исследована нуклеотидная последовательность левого домена контрольного региона только лишь у одной особи *Tetrao urogalloides urogalloides* из Хабаровского края, то иным объяснением ее отдаленности от других представителей этого подвида из Магаданской области и Якутии может служить не только относительно высокая степень дивергенции левого домена контрольного региона мт генома, но и значительный уровень внутривидового полиморфизма. Этот вопрос требует дальнейшего изучения. При исследовании внутривидового полиморфизма левого домена контрольного региона у подвидов *Tetrao urogallus volgenensis* 1864 и *Tetrao urogallus longbergi* 2147 нуклеотидных замен не обнаружено, тогда как между *Tetrao urogallus major* 1, *Tetrao urogallus longbergi* 2147 и *Tetrao urogallus volgenensis* 1864 выявлено 2 нуклеотидные замены. Хорошо согласуются между собой морфолого-экологические, этологические и генетические исследования гена цитохрома *b* и левого домена контрольного региона трех подвидов: *B. bonasia septentrionalis* ($n=6$), *B. bonasia yamashinae* ($n=5$) и *B. bonasia kolymensis* ($n=4$). Исследования внутривидовой дивергенции гена цитохрома *b* показали четкую дифференциацию трех вышеуказанных подвидов *B. bonasia*, но не отразили филогенетические взаимоотношения между ними. Исследования нуклеотидных последовательностей левого домена контрольного региона трех подвидов *B. bonasia* показали более тесную филогенетическую связь *B. bonasia yamashinae* и *B. bonasia kolymensis*, чем с *B. bonasia septentrionalis*. Величина разнообразия

гаплотипов внутри подвида максимальна для *B. bonasia yamashinai* (0,9), и всего один гаплотип выявлен для *B. bonasia septentrionalis*.

На основе полученных данных о нуклеотидных последовательностях левого домена контрольного региона мт ДНК были построены схемы филогенетического родства тетеревиных птиц методами ближайшего соседа (NJ) и UPGMA с использованием данных о Р-дистанциях. На рисунке 3 приведена дендрограмма родства левого домена контрольного региона мт генома тетеревиных, построенная методом UPGMA. *Tetrao urogalloides urogalloides* 269 находится в стороне от других представителей этого подвида из Якутии и Магаданской области, а также от *Tetrao urogalloides kamtschaticus*. *Tetrao urogallus volgensis* и *Tetrao urogallus longbergi* образуют один кластер и находятся в стороне от *Tetrao urogallus major*. *Lagopus mutus pleskei* из Магаданской области находится в более близком родстве с *Lagopus mutus nelsoni* с Аляски, чем с *Lagopus mutus* из Японии, что подтверждает трансберенгийские связи этих птиц. Информация о нуклеотидных последовательностях *Bonasa bonasia* и *Lagopus mutus*, обитающих в Японии, любезно предоставлена Yoshiyuki Baba. По мнению некоторых ученых (Kimball et al., 1999; Hillis, 1998; Yang, 1998), быстро эволюционирующие последовательности, в том числе контрольный регион, его левый и правый домены, могут быть удобными маркерами филогенетического родства и взаимоотношений не только для близкородственных таксонов (вид, подвид, популяция), но и для давно дивергировавших организмов. Для выяснения возможных филогенетических взаимоотношений у тетеревиных птиц нами была предпринята попытка анализа нуклеотидных последовательностей левого домена контрольного региона нескольких видов птиц этого семейства: *Bonasa bonasia*, *Bonasa umbellus*, *Lagopus mutus*, *Lagopus lagopus*, *Lagopus leucurus*, *Tetrao urogallus*, *Tetrao urogalloides*, *Falcipennis franclini*, *Falcipennis canadensis*. Филогенетические дендрограммы родства вышеназванных видов были построены методами максимальной экономии, максимального правдоподобия, ближайшего соседа (дендрограммы не приводятся). Ни одна из дендрограмм родства нуклеотидных последовательностей левого домена контрольного региона не может считаться достоверной (индексы бутстрэп-анализа значительно ниже 50%) и не отражает истинное филогенетическое родство птиц семейства тетеревиных. Скорее всего, это объясняется быстрой скоростью эволюции левого домена контрольного региона, в котором многократно появляются и исчезают нуклеотидные замены в "горячих" и "полугорячих" сайтах, что значительно затрудняет получение достоверной информации о количестве нуклеотидных замен с момента дивергенции давно дивергировавших видов.

5. Время дивергенции и трансберенгийские связи тетеревиных птиц.

Основываясь на данных о нуклеотидных последовательностях длиной 700 п.н., мы оценили время дивергенции некоторых видов тетеревиных птиц по формуле, предложенной Песола (G. Pesole et al., 1999). Согласно этой оценке, семейство тетеревиных является сравнительно молодым, дивергировавшим в плейстоцене, что согласуется с данными Андреева А. В (Андреев, 1997).

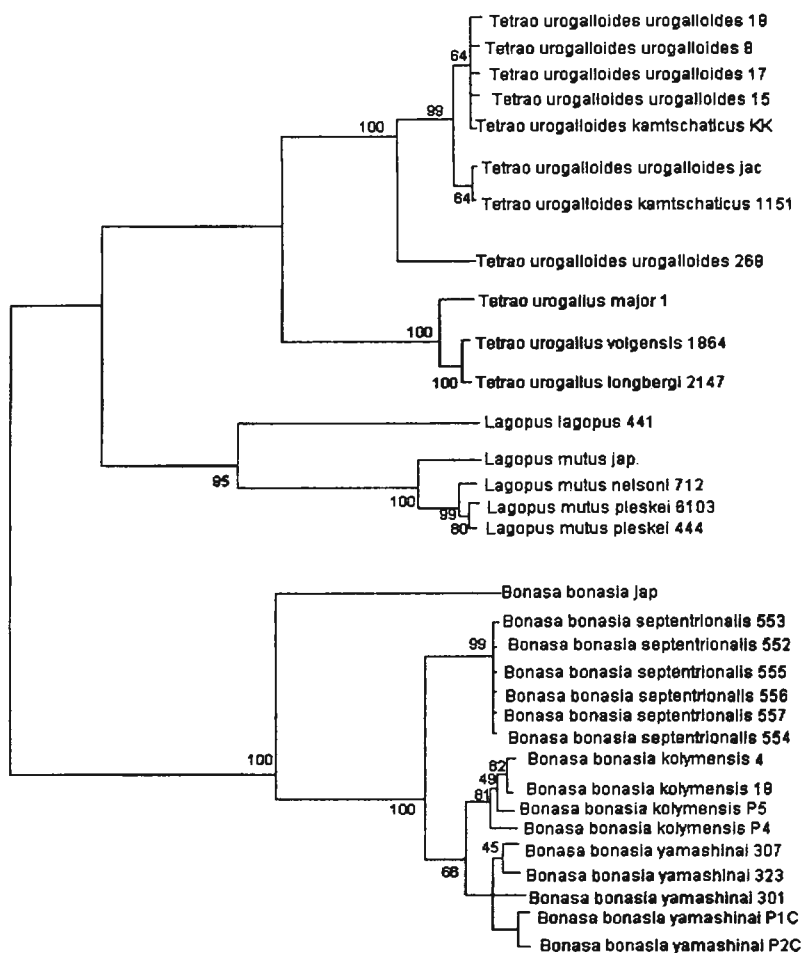


Рисунок 3. Схема родства нуклеотидных последовательностей левого домена контрольного региона мт генома у тетеревиных птиц, построенная UPGMA методом.

По мнению же Потапова (Потапов, 1985) дивергенция тетеревиных птиц началась значительно раньше, что в некоторой степени согласуется с результатами анализа времени дивергенции тетеревиных птиц с использованием “стандартных часов эволюции”. Следует отметить, что применение “стандартных часов эволюции” (2% нуклеотидных замен за 1 млн. лет) (Avice, 1994) для решения подобных вопросов не всегда позволяет получить достоверные результаты о времени дивергенции таксонов, поэтому исследователи подходят к этой проблеме осторожно. Например, допускают возможным варьирования скорости эволюции нуклеотидных последовательностей в пределах 2-4 % нуклеотидных замен за 1 млн. лет или, если это возможно, проводят ее калибровку согласно имеющимся данным о палеонтологических ископаемых (Masuda, 1994). Для воссоздания возможного варианта истории формирования тетеревиных птиц необходимо применять комплексный подход, то есть сопоставлять результаты о палеонтологических ископаемых тетеревиных, данные о палеогеографии притихоокеанских областей Азии и Америки, экологии и этологии птиц, данные об эволюции нуклеотидных последовательностей.

6. Молекулярная филогения гена c-mos ядерного генома тетеревиных птиц.

По мнению некоторых авторов (Гречко В. В., 2000), филогенетические построения на основе данных о мт геноме являются самодостаточными для изучения “исторической судьбы самих митохондрий и лишь косвенно, в той или иной степени, в какой их эволюция скоррелирована с эволюцией ядерной ДНК, связаны с общими вопросами видообразования”. К сожалению, в настоящее время не найден и хороший ядерный филогенетический маркер. Ряд исследований, посвященных поиску и изучению нуклеотидных последовательностей протоонкогенов, были успешными для решения некоторых спорных филогенетических вопросов. К числу таких ядерных протоонкогенов относится ген c-mos. Нами была предпринята попытка решения некоторых спорных вопросов, касающихся филогении тетеревиных птиц, основываясь на полученных данных о полиморфизме нуклеотидных последовательностях c-mos гена ядерного генома. Наше утверждение о полифилитическом происхождении *Bonasa bonasia* и *Bonasa umbellus*, основанное на полученных результатах филогенетического родства гена цитохрома b мт генома, подтверждается данными филогенетического анализа участка ядерного гена c-mos, поэтому мы согласны с предложением американских коллег о присвоении *Bonasa bonasia* нового таксономического ранга - *Tetrastes bonasia*. К сожалению, на другие филогенетические вопросы родства и взаимоотношений в семействе тетеревиных мы не имеем возможности ответить в силу малой информативности гена c - mos для относительно недавно дивергировавших таксономических единиц.

Выводы

1. Биохимический и генетический анализ гена цитохрома b показал, что данный участок мт генома соответствует основным требованиям филогенетического маркера и может быть успешно использован в качестве такового для изучения родства тетеревиных птиц.

2. Контрольный регион (левый домен) является удобным филогенетическим маркером для внутривидового и межпопуляционного родства тетеревиных птиц.
3. Полученные филогенетические схемы родства гена цитохрома b митохондриального генома у тетеревиных совпадают с морфо-экологической дифференциацией этого семейства, предложенной Потаповым Р. Л. В целом это свидетельствует о достаточно высокой степени корреляции эволюции ядерного и митохондриального геномов.
4. Согласно полученным данным о полиморфизме нуклеотидных последовательностей гена цитохрома b митохондриального генома и c-mos гена ядерного генома род Bonasa, имеет монофилитическое происхождение.
5. Согласно данным анализа полиморфизма нуклеотидных последовательностей у курообразных, индюк (*Meleagris gallopavo*) находится в более тесном филогенетическом родстве с семейством тетеревиные, чем серая куропатка (*Perdix perdix*).
6. Согласно данным о синонимичных заменах в гене цитохрома b митохондриального генома, семейство тетеревиных дивергировало в позднем плейстоцене.

Публикации по теме диссертации.

- 1). Буторина О. Т. Соловечук Л. Л. Дифференциация гена цитохрома b митохондриальной ДНК у трех подвидов рябчика *Bonasa bonasia*. Рус. орнитол. журн. 1998. Экспресс-выпуск 43: С. 9-12.
- 2). Буторина О. Т., Сейболд И., Хелбиг А., Соловечук Л. Л. Дивергенция гена цитохрома b тетеревиных птиц. Генетика. 2000. том 36. N7. С.925-931.
- 3). Буторина О. Т., Соловечук Л.Л. Эволюция гена цитохрома b митохондриальной ДНК у тетеревиных птиц. Генетика. 2000. Том 36. N. 9. С.1195-1199.
- 4). Baba, Y., Fujimaki, Y., Klaus, S., Butorina, O., Drovetskii, S. & Koike, H.: Population genetics for the hazel grouse *Bonasa bonasia* using mitochondrial control region sequences //The 8 International Grouse Symposium. P. 17.
- 5). Yoshuyuki Baba, Yozo Fujimaki, Siegfried Klaus, Olga Butorina, Sergei Drovetskii, Hiroko Koike. Molecular population phylogeny for hazel grouse *Bonasa bonasia* using mitochondrial control – region sequences. Wildlife Biology (в печати).
- 6). Буторина О. Т. Эволюция гена цитохрома b у тетеревиных птиц //сб. « Идеи, гипотезы, поиск [по материалам VII научной конференции аспирантов и соискателей и молодых исследователей] г. Магадан Из-во МПУ 2000, С.10.
- 7). Буторина О. Т., Соловечук Л. Л. Дивергенция гена цитохрома b митохондриального генома тетеревиных птиц [по материалам международной конференции “Актуальные проблемы изучения и охраны птиц Восточной Европы и Северной Азии”]. г. Казань. С.127-128.

Подписано в печать 5.04.2001. Формат 60/84/16.

Усл. печ. л. 1,5. Договор № 4. Тираж 100.

Лаборатория оперативной печати ТГТИ.
420036, г. Казань, ул. Побежимова 47а, тел. 544373

